

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

Requested document:	<a href="#">DE4441327 click here to view the pdf document</a>
---------------------	---

## Embryonal cardiac muscle cells, their preparation and their use

Patent Number: ☐ [US5928943](#)  
Publication date: 1999-07-27  
Inventor(s): WOBUS ANNA M (DE); FRANZ WOLFGANG-MICHAEL (DE)  
Applicant(s): INST PFLANZENGENETIK & KULTUR (DE)  
Requested Patent: ☐ [DE4441327](#)  
Application Number: US19970849706 19970822  
Priority Number(s): DE19944441327 19941122; WO1995DE01699 19951121  
IPC Classification: C12N5/06; C12N5/10; C12N5/16; C12Q1/02  
EC Classification: [C12N5/06B6C](#), [C12N15/85](#), [G01N33/50D2](#), [G01N33/50D2D](#)  
Equivalents: ☐ [EP0787182](#) (WO9616163), [A3](#), ☐ [WO9616163](#)

### Abstract

PCT No. PCT/DE95/01699 Sec. 371 Date Aug. 22, 1997 Sec. 102(e) Date Aug. 22, 1997 PCT Filed Nov. 21, 1995 PCT Pub. No. WO96/16163 PCT Pub. Date May 30, 1996 The invention concerns embryonal (cardiomyocytary and cardiomyoblastary) cardiac muscle cells, their preparation and their use, in particular for cell-mediated gene transplant. The areas of application of the invention are medicine and genetic engineering. The embryonal cardiac muscle cells according to the invention contain two gene constructs comprising: a) a regulatory, 1.2-kb long DNA sequence of the ventricle-specific myosin light-chain-2 (MLC-2v) promoter, the selectable marker gene beta -galactosidase in fusion with the reporter gene neomycin; and b) a regulatory DNA sequence of the herpes simplex virus thymidine kinase promoter and the selectable marker gene hygromycin, and optionally immortalizing genes and/or optionally genes inactivated by homologous recombination and/or optionally one or a plurality of therapeutic genes. The cells can advantageously be used for cell-mediated gene transplant, in particular for constructing healthy tissue and assisting contractile functions, for investigating substances, in particular for pharmacological investigations and for the transfer of therapeutic genes into the myocardium.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



*M 138039*

①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ Patentschrift  
⑩ DE 44 41 327 C 1

⑥1 Int. Cl.<sup>8</sup>:  
**C 12 N 15/79**  
C 12 N 5/10  
A 61 K 48/00  
A 61 K 35/34  
// C12Q 1/18, G01N  
33/15

②1 Aktenzeichen: P 44 41 327.0-41  
②2 Anmeldetag: 22. 11. 94  
④3 Offenlegungstag: —  
④5 Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung: 9. 11. 95

DE 44 41 327 C 1

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦3 Patentinhaber:  
Institut für Pflanzengenetik und  
Kulturpflanzenforschung, 06466 Gatersleben, DE

⑦2 Erfinder:  
Franz, Wolfgang-Michael, Dr., 69120 Heidelberg, DE;  
Wobus, Anna M., Dr., 06466 Gatersleben, DE

⑤6 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit  
in Betracht gezogene Druckschriften:  
Differentiation 48, S. 173-182, 1991;

⑤4 Embryonale Herzmuskelzellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung

DE 44 41 327 C 1

Die Erfindung betrifft embryonale (kardiomyozytäre und kardiomyoblastäre) Herzmuskelzellen, ihre Herstellung und ihre Verwendung, insbesondere zur zellvermittelten Gentransplantation. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin und die Gentechnik.

Es gibt bereits mehrere Arbeiten, die sich mit Herzmuskelzellkulturen von Säugetieren beschäftigen. Die ersten Untersuchungen wurden mit Primärkulturen von embryonalem, neonatalem oder adultem Herzgewebe durchgeführt. Vorteilhafter ist die Verwendung von permanenten Zelllinien von kardiomyozytärem Gewebe, weil man damit größere Mengen einer homogenen Zellpopulation auf einem definierten Entwicklungsstand zur Verfügung stellen kann. Deshalb hat es eine Reihe von Versuchen zur Immortalisierung von Herzmuskelzellen gegeben (u. a. A. Sen et al, J. Biol. Chem. 263/1988, 19132—19136). Alle bisherigen Zelllinien haben jedoch den Nachteil, daß sich bei einer Langzeitkultivierung funktionelle Defekte bemerkbar machen.

Die Erfindung hat das Ziel, ausgehend von pluripotenten embryonalen Stammzellen (ESC) oder Primordialen Keimzellen (EGC, Stewart et al, Dev. Biol. 161/1994, 626—628) nach deren Differenzierung in spontan Pulsierende Herzzellen embryonale kardiomyozytäre bzw. kardiomyoblastäre) Herzmuskelzellen zu gewinnen, welche weitgehend identische Eigenschaften mit Herzmuskelgewebe besitzen. Diese Zellen sollen für einen therapeutischen Einsatz, ggf. nach zusätzlicher gentechnischer Veränderung, geeignet sein. Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Vektorsystem zur Modifizierung der Stammzellen zu konstruieren und ein Selektionsverfahren für die transfizierten Zellen zu entwickeln.

Die Erfindung wird mit modifizierten embryonalen Stammzellen gemäß Anspruch 1 bis 4, den Vektorsystemen gemäß Anspruch 5 und 6 und den Selektionsverfahren gemäß Anspruch 7 realisiert. Zum Schutzzumfang der Erfindung gehört auch die Verwendung der modifizierten embryonalen Stammzellen gemäß Anspruch 8 bis 10.

Die erfindungsgemäßen Vektoren bestehen aus folgenden Bestandteilen:

- a) der regulatorischen, 2,1 kb langen DNA-Sequenz des ventrikelspezifischen Myosin-Leicht-Kette-2 (MLC-2v) als Promotor, dem selektionierbaren Markergen  $\beta$ -Galaktosidase und dem Reportergen Neomycin als Fusionsgen "pgeo" und dem SV40-PolyA-Tail(pAA) und ggf. einer Position zur Aufnahme von immortalisierenden Genen.
- b) der regulatorischen DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus Thymidinkinase-Promotors (HSV-Tk), dem selektionierbaren Markergen Hygromycin und dem SV40-PolyA-Tail (pAA).

Mit diesen Vektoren werden pluripotente embryonale Stammzellen in vitro transfiziert. Die erfolgreich transfizierten Zellen werden im ersten Schritt mit Hilfe von Hygromycin selektiert. Hygromycin-resistente Zellen werden dann zu sog. Embryoidkörpern ("embryoid bodies") differenziert. Danach erfolgt eine Selektion der Hygromycin-resistenten Embryoidkörper mit dem Zellgift Geneticin (G418). Die erhaltenen Zellen werden weitergezüchtet und auf ihre Zusammensetzung (Genexpression, Proteine), ihre Funktion und ihre kontraktile Eigenschaften untersucht.

Als Ausgangsmaterial können embryonale Stammzellen (ESC) oder primordiale Keimzellen (EGC) unterschiedlichster Herkunft, u. a. von Maus, Ratte, Schwein, Rind, Hund, Kaninchen, Hamster, einschließlich menschlicher Zellen, eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Vektoren und der Ablauf des Zellselektionsverfahrens sind in Abb. 1 dargestellt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung sind Zellen, die neben den genannten Vektoren a) und b) auch noch therapeutische Gene wie z. B. die Angiogenesefaktoren VEGF oder bFGF enthalten, welche durch viralen oder nichtviralen Gentransfer eingebracht wurden. Die so erhaltenen Zelllinien können — mit oder ohne virale Sequenzen — zur zellvermittelten Gentransplantation, insbesondere zum Aufbau gesunden Gewebes und zur Unterstützung kontraktile Funktionen, verwendet werden.

Eine weitere wichtige Verwendung der erfindungsgemäßen Zelllinien besteht in der in-vitro-Testung von biologisch aktiven Substanzen, insbesondere zur Untersuchung pharmakologisch relevanter Substanzen oder zur Feststellung toxischer Wirkungen exogener Wirkstoffe an Herzzellen in Kultur. Damit werden insbesondere in Screeningprogrammen Tierversuche eingespart und damit dringende Forderungen der Öffentlichkeit nach Tierversatzmodellen erfüllt.

Die Zelllinien können weiterhin als Vesikel für einen lokalen Gentransfer in das Myokard dienen. Dazu werden die gewünschten therapeutischen Gene durch ein virales, bevorzugt mit einem Adenovirus- oder einem Adenovirus-assoziierten-Virus-Shuttle-Vektor, oder ein nichtvirales Gentransferverfahren transfiziert. Bevorzugt erfolgt die Verpackung der Gene mit dem AAV-Vektor pSub201.

Durch die Erfindung wird erstmalig ermöglicht, Herzmuskelerkrankungen mit Hilfe des zellulären Gentransfers zu behandeln (Gentherapie). Das bedeutet einen erheblichen medizinischen Fortschritt, insbesondere können auch Erkrankungen wie ischämische und kongenitale Kardiomyopathien künftig mit größeren Erfolgsaussichten therapiert werden.

Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

1. Klonierung der Vektoren zur Selektion embryonaler (kardiomyozytärer und kardiomyoblastärer) Herzmuskelzellen

Zum Aufbau der Vektoren geht man von folgenden Elementen aus:

2.1 kb MLC-2v Promotor (klonierbar mit KpnI und EcoRI), Fusionsgen pgeo (klonierbar mit BamHI), SV40-PolyA (klonierbar mit SacI) und Tk-Hygromycin Fusionsgen im Blueskript KS-Vektor. Wie in Abb. 1 dargestellt, werden aus diesen Elementen 2 Vektoren für die Kotransfektion in pluripotente embryonale Stammzellen erstellt:

- (A) 2,1 MLC-2v-pgeo
- (B) Tk-Hygromycin.

2. Kotransfektion der Vektoren in pluripotente Stammzellen (ES-Zellen) und Selektion mit Hygromycin B

Als Pluripotente Stammzelllinie kann jede ES-Zelllinie verwendet werden, die in Kardiomyozyten differenziert (Wobus et al, Differentiation 48/1991, 173—182), z. B.

die Linie D3 (Doetschmann et al, J. Embryol. Exp. Morphol. 3/1985, 27—45). Die D3-Zellen werden auf gelatinisierten Platten mit standardisiertem Kulturmedium auf feeder-layer oder in Anwesenheit des rekombinanten "Leukemia-Inhibiting-Factor"(LIF) kultiviert. Der LIF entspricht dem "Differentiation Inhibiting Factor", welcher die Differenzierung der ES-Zellen verhindert und die Zellteilung der pluripotenten ES-Zellen fördert. Die in Abb. 1 dargestellten DNA-Konstrukte werden durch Elektroporation in die ES-Zellen eingebracht. Hierfür werden die Vektoren mittels Restriktionsverdau linearisiert und in einer Konzentration von 25 µg/ml mittels Elektroporation transfiziert. Danach werden die Pluripotenten ES-Zelllinien im LIF/ES-Zellmedium expandiert. In den undifferenzierten ES-Zellen ist nur der Thymidinkinase-Promotor aktiv, was zu einer Expression des Hygromycin-Resistenzgens führt. Durch Zugabe von Hygromycin B werden die ES-Zellen auf den Einbau der Fremd-DNA hin selektiert (Positiv-Selektion).

### 3. Nachweis der Integration von MLC-2v-βgeo in ES-Zellen und "embryoid-bodies"

Zur Gewinnung von "embryoid bodies" wird das Differenzierungssystem des hängenden Tropfens benutzt. Hierbei wird eine Zellsuspension, die etwa 400—600 ES-Zellen in 20 µl enthält, auf die Deckel von Petrischalen pipettiert, die mit einer physiologischen Pufferlösung gefüllt sind. Die Zellen sammeln sich im Tropfen und bilden nach zwei- bis dreitägiger Inkubation "embryoid bodies". Nach 7 Tagen werden die "embryoid bodies" auf Mikrotestgewebekulturschalen übertragen, wo sie auf dem Gelatine-beschichteten Substrat anhaften. Während der darauffolgenden Kultivierung wachsen verschiedene Zelltypen, u. a. Herzmuskelzellen, aus (Abb. 2). Zwei bis zehn Tage nach Ausplattierung enthalten etwa 80 bis 90% der ausgewachsenen "embryoid bodies" Kolonien spontan und synchron kontrahierender Herzmuskelzellen (Wobus et al, 1991). In diesen embryonalen Herzmuskelzellen ist der MLC-2v Promotor aktiv. Bei erfolgreicher Transfektion und Integration des MLC-2v-βgeo Vektors in das Genom der ES-Zellen kommt es zur Expression des Fusionsgens β-Galaktosidase/Neomycin. Durch Blaufärbung im β-Galaktosidase-Assay lassen sich die kardiomyozytären Zellen, welche klonalen Ursprungs sind, identifizieren.

### 4. Selektion embryonaler kardiomyozytärer und kardioblastärer Zellen

In einem zweiten Schritt werden die positiven ES-Zellklone, welche sowohl das Tk-Hygromycin als auch das MLC-2v-βgeo Fusionsgen enthalten, erneut expandiert und ein Teil unter den oben beschriebenen Bedingungen zur Differenzierung in "embryoid bodies" gebracht. Zum Zeitpunkt der kardiomyogenen Differenzierung im Embryoidkörper wird das Zellgift Geneticin (G418) in einer Konzentrationen von 300 µg/ml zu den "embryoid bodies" gegeben. Damit werden die embryonalen (kardiomyozytären bzw. kardiomyoblastären) Herzmuskelzellen in einem frühen Stadium selektiert.

Die gewonnenen Zellen werden auf gewebespezifische Genexpression, funktionelle Eigenschaften mit Hilfe elektrophysiologischer Techniken und auf ihre kontraktilen Eigenschaften untersucht, die Zusammensetzung der kontraktilen Proteine wird mit entsprechenden monoklonalen Antikörpern charakterisiert. Im Rah-

men einer Gentherapie können teilungsfähige schlagende Zellen anschließend auf adulte und neonatale kardiomyopathische mdx-Mäuse nach Thorakomie und direkter Injektion in das Myokard übertragen werden.

### Patentansprüche

1. Embryonale Herzmuskelzellen, enthaltend zwei Genkonstrukte aus zwei verschiedenen regulatorischen DNA-Sequenzen und zwei verschiedenen selektionierbaren Markergenen.

2. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1, enthaltend zwei Genkonstrukte aus

a) regulatorischer, 2,1 kb langer DNA-Sequenz des Ventrikelspezifischen Myosin-Leicht-Kette-2 (MLC-2v) Promotors, dem selektionierbaren Markergen β-Galaktosidase und dem Reportergen Neomycin,

b) regulatorischer DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors und dem selektionierbaren Markergen Hygromycin.

3. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1 und 2, enthaltend zusätzlich immortalisierende Gene und/oder durch homologe Rekombination inaktivierte Gene und/oder ein oder mehrere therapeutische Gene.

4. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1 bis 3, enthaltend zusätzlich Sequenzen des Adenovirus (Ad) oder des Adenoassoziierten Virus (AAV).

5. Embryonale Herzmuskelzellen gemäß Anspruch 1 bis 4, enthaltend zusätzlich einen Angiogenesefaktor, bevorzugt "vascular endothelial growth factor", VEGF, oder "basic fibroblast growth factor", bFGF, unter der Kontrolle eines in diesen Zellen aktiven Promotors als therapeutisches Gen.

6. Vektor, bestehend aus MLC-2k Promotor, selektionierbarem Markergen β-Galaktosidase und dem Reportergen Neomycin als Fusionsgen "βgeo", SV40-Poly A-Tail und ggf. einer Position zur Aufnahme von immortalisierenden Genen.

7. Vektor, bestehend aus regulatorischer DNA-Sequenz des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Promotors und dem selektionierbaren Markergen Hygromycin.

8. Verfahren zur Herstellung von Zellen nach Anspruch 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß embryonale Stammzellen (ESC) oder primordiale Keimzellen (EGC) mit den Vektoren nach Anspruch 6 und 7 kotransfiziert werden, die Selektion der embryonalen Stammzellen mit dem Zellgift Hygromycin erfolgt, nach Induktion der in vitro Kardiogenese anschließend die Selektion der embryonalen Herzzellen mit dem Zellgift Geneticin (G418) erfolgt, die erhaltenen Zellen ggf. mit den gewünschten therapeutischen Genen durch ein virales, bevorzugt mit einem Adenovirus- oder einem Adenovirus-assoziierten-Virus-Shuttle-Vektor, oder ein nichtvirales Gen-transferverfahren transfiziert werden.

9. Verwendung der embryonalen Herzmuskelzellen nach Anspruch 1 bis 4 zur zellvermittelten Gentransplantation, insbesondere zum Aufbau gesunden Gewebes und zur Unterstützung kontraktile Funktionen.

10. Verwendung der embryonalen Herzmuskelzellen nach Anspruch 1 bis 4 zur Untersuchung von

Substanzen, insbesondere für pharmakotoxikologische Untersuchungen.

11. Verwendung der embryonalen Herzmuskelzellen nach Anspruch 1 bis 5 für den Transfer therapeutischer Gene in das Myokard.

5

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

10

15

20

25

30

35

40

45

50

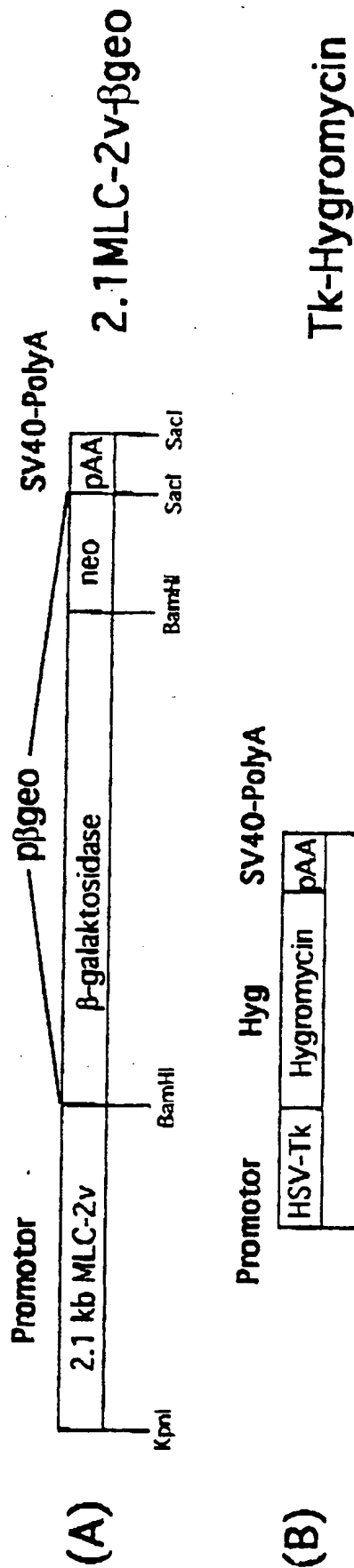
55

60

65

# Abbildung 1:

## Selektion der embryonalen Herzmuskelzellen



(C) Kotransfektion von Tk-Hygromycin und 2.1MLC-2v- $\beta$ geo in ES-Zellen<sup>(EG)</sup>

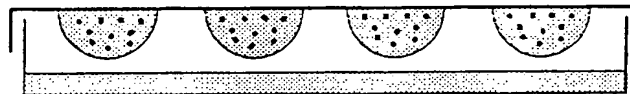
- Selektion der transfizierten ES<sup>(EG)</sup>-Zellen mit Hygromycin
- Differenzierung der Hyg-resistenten ES<sup>(EG)</sup>-Zellen zu "embryoid-bodies"
- Selektion von Herzmuskelzellen aus "embryoid-bodies" mittels G418
- Charakterisierung der Hyg- und G418-resistenten Zellen auf kardiomyozytäre bzw. kardiomyoblastäre Eigenschaften

*Abbildung: 2*

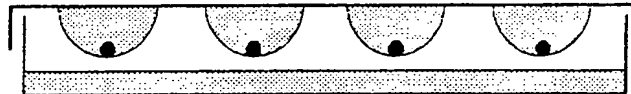
Embryonale Stammzellen kultiviert auf "feeder layer"



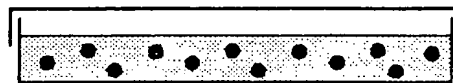
Kultivierung von 400 oder 600 Zellen/20µl Medium  
in hängenden Tropfen



Inkubation für 2 Tage



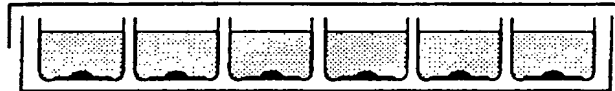
Umsetzen der "embryoid bodies" und  
Kultivierung in Suspension



Inkubation für 5 Tage



Ausplattieren von "embryoid bodies"  
auf 24-well Gewebe-Kulturplatten



Inkubation bis zu 20 Tagen



1. PCR Analyse
2. Enzymatische Dissoziation  
der Cardiomyocyten
3. Immunfluoreszenz
4. "Patch-clamp"- Versuche